Über die Verwendung von Hühnereiweiss
zu
Nährböden für bakteriologische Untersuchungen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt der
hohen medizinischen Fakultät
der
k. b. Friedrich-Alexanders-Universität zu Erlangen
im Juli 1894
von

Josef Gundlach,
prakt. Arzt
in Waischenfeld.

Erlangen.
K. b. Hofbuchdruckerei von Aug. Vollrath.
1894.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
zu Erlangen.

Referent: Herr Professor Dr. J. Rosenthal.

Von dem Zeitpunkte an, mit welchem niederen pflanzlichen Organismen eine pathogene Bedeutung zuerkannt wurde, hat man sich bemüht, die Pilze und Bakterien, welche hier in Frage kommen, künstlich zu kultivieren. Bevor Robert Koch mit seinen epochemachenden Arbeiten bahnbrechend im Gebiete der Bakterienforschung auftrat, stellte man solche künstliche Züchtungsversuche nach den verschiedensten Methoden an. Es sei mir gestattet, die gebräuchlichsten Methoden und deren Modifikationen kurz zu erwähnen.

1) Die älteste Methode

ist die der durchsichtigen flüssigen Nährmedien; sie liegt allen Gährungsexperimenten der früheren Zeit zu Grunde. Für Bakterien wurde sie von Pasteur bei seiner ersten Arbeit zur vitalistischen Gährungstheorie schon angewendet. Sie besteht im Prinzip darin, dass man eine Spur der ursprünglichen, Gährungsorganismen enthaltenden Flüssigkeit oder eine Spur der in derselben enthaltenen „Hefe“ in eine der ursprünglichen möglichst ähnlich zusammengesetzte Flüssigkeit überträgt, von dieser wieder eine Spur in eine dritte Lösung u. s. w.

Eine solche „Spur“ oder ein „Bakterientropfen“ enthält meist grosse Mengen von Bakterien. Infolge dessen entwickelt sich zunächst diejenige Art, welche in der neuen Lösung die besten Existenzbedingungen findet. Wenn das Nährmaterial für die eine Art erschöpft ist, kann sich dann später, vorausgesetzt, dass sich in der übertragenen Spur mehrere Bakterienarten befanden, vielleicht die eine oder andere zuerst unterdrückte Form entwickeln. Schliesslich erhält man bei irgend einer Übertragung einmal eine mehr oder weniger reine Kultur von einem Organismus. Aber dies ist durchaus nicht immer, sondern eher selten der Organismus, welchen man wirklich isolieren will; meistens enthält die schliesslich resultierende Reinkultur eine der gewöhnlichen saprophytischen Arten, welche unter den gewählten Bedingungen die anderen empfindlichen Arten verdrängt.

Man lernte auf diese Art eine Abhängigkeit der Bakterienvegetation vom Nährboden kennen. Dies führte erstens dazu, solche Flüssigkeiten zu wählen, welche möglichst vielen Arten annähernd gleich günstige Bedingungen bieten sollten. Solche universal verwertbare Lösungen bezeichnet man oft als Normallösungen im Gegensatz zu den prinzipiell anders gewählten Lösungen, welche einem ganz speziellen Zweck dienen sollten. Man variierte demgemäss zweitens die Lösungen derart, dass sie für einen ganz konkreten Fall die relativ besten wurden, in der Hoffnung, dass in einer solchen Lösung im Gegensatz zu den Normallösungen eine bestimmte Art alle übrigen unterdrücken würde.

Von diesen künstlichen Normallösungen seien erwähnt die „Pasteur'sche Flüssigkeit“ als die älteste, die von Miquel bereitete Fleischbrühe, die Löffler'sche Bouillon und die wegen ihrer Undurchsichtigkeit weniger universell verwertbare sterilisierte Milch.

2) Die fraktionierten Kulturen.

Die Übertragung in Nährflüssigkeiten wurde von Klebs zuerst für pathogene Bakterien versucht und dabei von ihm die Spur oder der Bakterientropfen anderer Autoren als *fractio* bezeichnet. Klebs verfuhr in der Art, dass er frisch ausgezogene und fein zugespitzte Kapillarröhren auf den Boden der pilzhaltigen Flüssigkeit einsenkte und dort die Spitze abbrach; das herausgezogene, innen und aussen mit pilzhaltiger Flüssigkeit benetzte Röhrchen wurde wieder zugeschmolzen, mit starkem Alkohol aussen gereinigt und in einer pilzfreien Vegetationsflüssigkeit, die sich unter einer Ölschicht in einer Stöpselflasche befand, wiederum zerbrochen. Diese Procedur wurde öfters wiederholt, und in dieser Weise ist es möglich, etwaige Verunreinigungen, die in der Ursprungsflüssigkeit enthalten sein mögen, zu entfernen und denjenigen Organismus rein zu erhalten, welcher in der ersteren in überwiegender

Menge vorhanden war. Trotz des subtileren Arbeitens und der schärferen Betonung des Ausganges von einem an Zahl überwiegenden Organismus hat diese Methode keine wesentlichen Fortschritte gemacht. Auch bei dieser Modifikation der Pasteur'schen Methode stellte es sich leider evident heraus, dass in der Regel nicht der gewollte pathogene Organismus nach einer Reihe von Fraktionen rein vorhanden war, sondern dass meist irgend eine zu Anfang wegen der geringen Zahl vielleicht ganz übersehene oder durch Luftinfektion oder Manipulationen hineingebrachte Art von gewöhnlichen saprophytischen Bakterien rein gewonnen wurde, welche unter den gewählten Bedingungen besser fortkam, als die empfindlicheren pathogenen Bakterien, die, wie wir jetzt wissen, von den Saprophyten meist sogar schnell überwuchert werden.

Man bekommt durch die bis jetzt geschilderten Methoden wohl schliesslich Reinkulturen, ohne es aber genügend in der Hand zu haben, als Resultat diejenigen Arten rein zu erhalten, welche man rein haben will. Diese Methoden sind deshalb nur noch dann zu verwenden, wenn man irgend einen Organismus in Rein- oder Massenkultur erlangen will, dessen Herkunft und Wirkung mehr gleichgültig ist.

3) Undurchsichtige feste Nährsubstrate.

Hieher gehören die Versuche mit gekochten Kartoffelscheiben, einem Nährmaterial, das zunächst von Schröter angewendet und später von Koch wesentlich verbessert wurde. Die gereinigte Kartoffel wird mit Sublimat desinfiziert, bis zur sicheren Sterilisierung gekocht, nach der Abkühlung unter antiseptischen Cautelen durchschnitten und dann mit der Schnittfläche nach oben in sogenannte feuchte Kammern gelegt. Die so vorbereitete Kartoffelscheibe wird dann mit Hilfe einer vorher ausgeglühten und wieder abgekühlten Platinnadel geimpft.

Der grosse Vorteil dieses Verfahrens gegenüber den früher geschilderten Methoden der durchsichtigen flüssigen Medien besteht darin, dass jeder absichtlich geimpfte oder durch Luftinfektion auf die Kartoffelscheibe gelangte Keim isoliert am Orte seiner Berührung mit der Kartoffel zu einer Kolonie auswächst, während in der Flüssigkeit sich differente Keime vermischen.

4) Die Gelatinekulturen von Klebs und Brefeld.

Klebs versuchte irgend einen Coccus unter dem Mikroskope zu fixieren, um seine Teilung direkt zu beobachten und so die ganze Reinkultur auf einen einzelnen Keim zurückzuführen. Dies gelang ihm aber in Flüssigkeitstropfen nicht, einerseits wegen der Bewegung, welche sich im Flüssigkeitstropfen einstellte, andrerseits wegen der durch Luftzutritt entstehenden Verdunstung der Flüssigkeit. Um nun diese beiden störenden Momente zu vermeiden, bediente er sich statt der gewöhnlichen Nährlösungen als Kulturboden einer Lösung von gekochter Hausenblase, welche beim Abkühlen erstarrte. Zum Zwecke der Beobachtung fixierte er einen einzelnen in der Hausenblase befindlichen Coccus in den von Recklingshausen-Geissler'schen Glaskammern, welche eine bequeme Beobachtung unter dem Mikroskop gestatten.

5) Die Verdünnungsmethode.

Der erste, welcher für Bakterien mit positivem Erfolge und zum Zwecke der Gewinnung von Reinkulturen die Verdünnung soweit betrieb wie Pasteur für Hefe, war Lister. Er verdünnte sauere Milch derart, dass ein Tropfen derselben nur einen Keim enthalten sollte; impfte er nun sterilisierte Milch mit 2 — 4 Tropfen der Verdünnung, so erhielt er stets Säuerung und Gerinnung. Mit dieser Methode beschäftigten sich noch Fitz, Buchner, Nägeli, Hansen und Zeiss.

6) Kulturen im Haarröhrchen nach Salomonsen.

Bei der spontanen Veränderung des Blutes durch Fäulnis beobachtete Salomonsen, dass sich im Blute schwarze Fäulnisflecke durch Reduktion des Oxyhämoglobins bilden. Jeder solcher Fleck ist eine Kolonie, eine echte Reinkultur einer einzigen Art. Saugt man nun frisches oder defibriniertes Blut in Haarröhrchen ein, so entstehen in dem Blute innerhalb eines Röhrchens gleichfalls derartige isolierte Fäulnisflecke. Unter den so entwickelten Kolonien bemerkt man mit schwächeren Vergrösserungen kleine Differenzen in der Grösse, der Schnelligkeit des Wachstums und in den Formen.

Jede solche kleine Differenz ist ein sichtbares Zeichen, dass derartige differente Kolonien verschiedenen Bakterienformen ihren Ursprung verdanken. Will man nun eine solche Reinkultur zu Übertragungen verwenden, so bricht man das Röhrchen in der Nähe eines Fäulnisfleckes durch, taucht eine vorher geglühte Platinnadel in den Fleck ein und überträgt die so entnommenen Keime in eine sterilisierte Lösung. Ähnlich ist das Entstehen von isolierten Fäulnisflecken oder überhaupt von Bakterienkolonien in Substanzen, welche spontan, wie das Blut durch die Bildung der Cruorschicht, fest werden oder gelatinieren, während in wirklichen Lösungen eine solche scharfe Isolierung auch im Haarröhrchen nicht eintritt. Mit Berücksichtigung dieses, damals von Salomonsen noch nicht vollständig erkannten, Punktes war diese Methode bis vor wenigen Jahren eine der zuverlässigsten, um wirkliche Reinkulturen zu erzielen.

7) Die Infektionsmethode.

Die sowohl durch klinische Beobachtungen und Thatsachen der Epidemiologie als auch durch experimentelle Erfahrungen festgestellte Übertragung vieler Infektionskrankheiten führte, nachdem man manche dieser Krankheiten in Beziehung zu Bakterien zu bringen gelernt hatte, dazu, die Infektionsmethode auch bei der Züchtung der Bakterien anzuwenden.

Man hatte die Erfahrung gemacht, dass gewisse Tiere — Mäuse, Kaninchen, Meerschweinchen, Hühner, Tauben — eine besondere (spezifische) Empfindlichkeit gegen gewisse pathogene Mikroorganismen zeigen, und indem man den genannten Tieren solche Krankheitserreger einimpfte, war es gelungen, aus deren Blute Reinkulturen von gewissen spezifischen pathogenen Mikroorganismen zu erzielen.

Die Vorteile aller oben angeführten Methoden waren bis vor etwa 16 Jahren immer nur isoliert zur Anwendung gekommen. Das verbindende Glied, welches gestattete, die meisten dieser

Vorteile derart zu vereinigen, dass durch diese Verbindung die universellste und zugleich einfachste aller Methoden resultierte, fand erst R. Koch. Eine einfache Beobachtung, ich meine die Vorgänge, welche man an einer an der Luft liegenden gekochten Kartoffel machen kann, brachte ihn auf den Weg, die festen und zugleich die festen und durchsichtigen Nährböden als bestes Züchtungssubstrat einzuführen.

Die Vorteile des festen Nährbodens liegen auf der Hand. Während verschiedenartige Keime, wenn sie in flüssige Nährmedien zufällig gelangen oder eingeführt werden, in regelloser und unentwirrbarer Mischung durcheinander wachsen, sind sie auf festen Nährböden gezwungen, an Ort und Stelle zu bleiben, getrennt und begrenzt sich zu vermehren und als isolierte Kulturen in Erscheinung zu treten. Während in dem Durcheinander der flüssigen Kultur die charakteristischen Erscheinungsformen der einzelnen Arten verloren gehen, ermöglicht das abgesonderte Wachstum der Kolonien die Entfaltung sinnfälliger Merkmale in der äusseren Erscheinung, welche namentlich nach Farbe, Oberflächengestaltung, feuchtem Glanz oder Trockenheit, glattem oder geringeltem Aussehen und noch vielen mannigfaltigen Besonderheiten bei den einzelnen Arten und Gattungen der koloniebildenden Mikrophyten häufig deutlich unterscheidbar sich schon dem blossen Auge aufdrängen.

Der einmal gefundene Vorteil, der sofort zum leitenden Gesichtspunkt wurde, gab zu einer Fülle von neuen Verbesserungen Anlass, und den Reflexionen, welche Robert Koch an seine Beobachtungen knüpfte, entquoll ein Schatz von Erfahrungen, die, reformatorisch in die bakteriologische Forschung eingreifend, eine Sicherheit in der Handhabung des Züchtungsverfahrens bewirkten, welcher wir einzig die Erfolge der Gegenwart auf genanntem Gebiete verdanken.

Gleich die ersten Beobachtungen an den Kartoffelscheiben lehrten, dass man die als Einzelkolonien in Erscheinung tretenden Bakterienarten nun fort und fort von Kartoffel zu Kartoffel übertragen und so weiter züchten könne, und es wurde unter Zuhilfenahme jener Kautelen, welche ein Überwuchern durch zufällig auf die Kartoffel gefallene Keime hintanhalten, nicht schwer, tadellose Reinkulturen zu erhalten.

Die gekochte Kartoffel bietet als festes Nährsubstrat einer sehr grossen Menge von Mikrophyten die günstigsten Nährbedingungen, darunter auch nicht wenigen, welche als Krankheitserreger bekannt geworden sind; aber es gibt auch deren, welchen die Kartoffel als Vegetationsstätte durchaus nicht zusagt. Man musste daher noch andere feste Nährböden aufsuchen, um auch solche auf der Kartoffel nicht gedeihende Bakterien isoliert kultivieren zu können. Und da es überhaupt kein für alle Mikroorganismen gleich gut geeignetes, sozusagen, Universalmedium gibt, da vielmehr auch die Mikrophyten wie die höheren Pflanzen ein verschiedenes Erdreich und Klima beanspruchen, so musste die Zusammensetzung dieser festen Nährsubstrate variiert werden.

Koch stellte sich die Aufgabe, die schon bekannten und teilweise neu bewährten Nährlösungen in feste starre Form überzuführen; seine Untersuchungen führten ihn auf die Gelatine als starrmachendes Zusatzmittel zu Nährflüssigkeiten. Diese glückliche Neuerung setzte die grossen Vorteile der festen Nährböden noch mehr in den Vordergrund, weil sie neue Vorzüge kennen lehrte. War die Kartoffel noch ein undurchsichtiger Körper, der uns nur auf der Oberfläche die Kolonien nach Farbe und sonstigem Verhalten dem blossen Auge vorführte, so gab die Nährgelatine als durchsichtiger Nährboden noch weit mehr Gelegenheit, die Kulturen in ihren jüngsten Entwicklungsstufen zu erkennen und sie sowohl mit unbewaffnetem Auge als auch bei Verwendung der Gelatine zu dünnschichtigen Plattengüssen unter dem Mikroskope zu durchmustern. Der Umstand, dass das genannte Nährsubstrat in der Wärme sich verflüssigte, in der Kälte aber erstarrte, machte es möglich, dass man die Gelatine zum Plattenguss verwenden konnte; dadurch war man im stande, die gewünschte Isolierung von Keimen und ein getrenntes Wachstum derselben herbeizuführen. War es nun endlich gelungen, auf diesem Nährsubstrat wirklich reine Kolonien zu züchten, so fehlten den einzelnen Bakterienarten doch noch die Bedingungen, in der Gelatine sich so weiter zu entwickeln, dass man alle ihre charakteristischen Eigenschaften hätte verfolgen können.

Man versuchte daher, den rein gezüchteten Bakterienarten

Nährsubstrate zu bieten, die reich an Kohlenhydraten, Eiweisskörpern u. s. w. waren, und so machte man Züchtungsversuche von Reinkulturen auf Kartoffelbrei, Milchreis, Blutserum und Alkalialbuminat, um aus den besonderen Erscheinungen, welche die einzelnen Kolonien auf diesen Nährböden zeigen (makroskopische Wuchsform, Farbstoffbildung), weitere charakteristische Merkmale derselben zu gewinnen.

Es würde zu weit führen, wollte ich an dieser Stelle alle die Vorteile der letztgenannten Nährsubstrate aufzählen, welche sie bei der Züchtung einzelner Bakterienarten bieten; ich wende mich allein dem Alkalialbuminat zu, das ich zum Gegenstand einer Experimentaluntersuchung gemacht habe, über deren Resultate die vorliegende Arbeit berichtet.

Nachdem Lieberkühn bereits vor mehreren Decennien gezeigt hatte, dass Hühnereiweiss bei Zusatz von Natron- oder Kalilauge glasig gerinne, haben zuerst Fürst Tarchanoff sowie Mourawoff und Kolesnikoff einen durchsichtigen Nährboden aus Eiweiss mit Hilfe von Alkalien erzielt. Es wurden Hühnereier mit der Schale 4 Tage lang in 5 — 10 $^0/_0$ige Kalilauge gelegt; das Eiweiss war dann flüssig-gelatinös und durchsichtig. Davon bereiteten sie:

1. Bouillonalbuminate durch Verdünnen mit Wasser im Verhältnis 1 : 10,
2. syrupartiges Alkalialbuminat durch Verdünnen mit Wasser im Verhältnis 1 : 2,
3. festes Alkalialbuminat ohne Wasserzusatz durch Sterilisieren bei 105° (in Reagensgläsern). Liessen sie die Eier 14 Tage in der Lauge, so wurde das Eiweiss, ohne seine Durchsichtigkeit zu verlieren, gelatineartig fest und konnte, in feine Scheiben zerschnitten, nach Art der Kartoffelscheiben verwendet werden.

Von diesem Tarchanoff'schen Albuminat ausgehend, haben J. Rosenthal und O. Schulz ein einfacheres Verfahren zur Herstellung eines festen und durchsichtigen Nährbodens aus Eiereiweiss und Alkalilauge angegeben. Die Bereitung dieses Alkalialbuminats ist folgende: Frisches Hühnereiweiss wird durch eine doppelte Lage von Musselin gepresst und dem vollkommen klaren, von Luftblasen freien Filtrat in einem mit eingeschliffenem Stopfen versehenen Messcylinder stark verdünnte Natronlauge und verdünnte neutrale Nährbouillon zugegeben, dann die Masse einige Stunden sich selbst überlassen und unterdessen durch wiederholtes Hin- und Herneigen (nicht Schütteln) innig durchgemischt. Die geeignetste Zusammensetzung des in wohl sterilisierten Gefässen angesetzten Nährsubstrates ist:

Hühnereiweiss . . . . 5 ccm,
1 $^0/_0$ Natronlauge . . . . 2,2 ccm,
Fleischwasser-Peptonlösung,
$^1/_2$ $^0/_0$ Kochsalzlösung,
beide zu gleichen Teilen vermischt, 2,8 ccm.

Es wird in sterilisierte Reagensgläser abgefüllt und in nahezu siedendem Wasser zum Erstarren gebracht.

Die Erfahrungen, die im Verlauf mehrerer Jahre bei der Herstellung und Verwendung dieses Nährbodens gemacht wurden, haben nun gezeigt, dass er nicht immer in durchaus befriedigender Weise ausfällt, sei es, dass beim Erhitzen leicht Gelbfärbung eintritt, oder dass die Konsistenz und Durchsichtigkeit des Alkalialbuminates zu wünschen übrig lässt. Nach den in dieser Richtung gewonnenen Beobachtungen waren die Ursachen für den wechselnden Ausfall des Nährbodens in der wechselnden Zusammensetzung des Eiereiweisses und in seinem schwankenden Verhalten gegenüber dem Alkali zu suchen.

Auf Anregung des Herrn Professor Dr. J. Rosenthal habe ich deshalb unternommen, das chemische Verhalten des Hühnereiweisses gegen Alkali zu prüfen und im Anschluss an die von J. Rosenthal und O. Schulz gegebenen Vorschriften diejenigen geringsten Mengen von Alkali und Wasser zu bestimmen, welche mit Hühnereiweiss in jedem Fall ein festes, für bakteriologische Zwecke brauchbares Alkalialbuminat liefern.

In der Ausführung der Versuche habe ich mich, soweit es anging, an J. Rosenthal und O. Schulz sowie an E. Geissler[1]) angeschlossen; Abweichungen hiervon werden bei den einzelnen Versuchsreihen erwähnt werden. Hier wäre nur das zu bemerken, dass alle Eiweissmischungen, die in Reagensgläsern, Bechergläsern, Kolben u. s. w. auf 40, 90 oder 100° C. erhitzt werden sollten, nicht in ein Wasserbad, sondern in ein auf die verlangte Temperatur eingestelltes Glycerinbad gebracht wurden. Ein Glycerinbad bietet vor dem Wasserbad den grossen Vorteil, dass seine Temperatur sich leichter konstant halten lässt, und dass der Experimentator nicht durch Wasserdämpfe belästigt wird.

---

[1]) E. Geissler, Beiträge zur Kenntnis des Hühnereiweisses. Inaug.-Diss. Erl. 1889.

I. Verhalten von Hühnereiweiss gegen verdünnte Schwefelsäure und gegen verdünnte Alkalilaugen.

Es kam zunächst darauf an, über das chemische Verhalten des Hühnereiweisses, d. h. über seine basische und sauere Natur eine bestimmtere Vorstellung zu gewinnen. Die hierauf sich richtenden Versuche wurden in folgender Weise angestellt:

Aus einer in $^1/_{10}$ ccm eingeteilten Bürette wurden immer 5 ccm Hühnereiweiss, welches, von frischen Eiern entnommen, vorher durch eine doppelte Lage Musselin unter mässigem Drucke filtriert worden war, in einen kleinen Glaskolben gebracht und dann eine bestimmte Menge 1%iger Natronlauge aus einer gleichen Bürette zugesetzt, hierauf diese Mischung mit $^1/_4$-Normalschwefelsäure titriert, wobei Phenolphtalein als Indikator diente. Die Natronlauge stand entsprechend ihrem Gehalt an Natriumhydrat so ein, dass zur Neutralisation von 1 ccm Lauge genau 1 ccm der $^1/_4$-Normalschwefelsäure nötig war.

Bevor ich zur Besprechung der Versuche selbst übergehe, sei erwähnt, dass ich zuerst eine Reihe von Vorversuchen anstellte, bei denen ich Lackmuslösung als Indikator benützte. Als ich nachher zum Vergleich mit Phenolphtalein als Indikator titrierte, ergaben sich nicht unerhebliche Differenzen in den Resultaten der Titrationen, was sich daraus erklärt, dass bei Anwendung von Lackmuslösung als Indikator der Farbenumschlag nicht rasch, sondern ganz allmählich erfolgte, so dass ich oft im Zweifel war, wann ich mit dem Säurezusatz aufhören sollte. Ich brach deshalb die Versuche mit Lackmuslösung als Indikator ab und titrierte nur mit Phenolphtalein.

Die Ergebnisse der Titrationen stelle ich der Übersichtlichkeit halber tabellarisch zusammen.

I. Natronreihe.

A. Bei Zimmertemperatur.

1. Versuchsreihe.

1. 5 E[1]) + 1,0 NaOH brauchen 2,0 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ „ 3,0 „
3. „ „ + 3,0 „ „ 4,0 „
4. „ „ + 4,0 „ „ 5,0 „
5. „ „ + 5,0 „ „ 6,0 „

Diese Versuchsreihe zeigt, dass durchweg ein ccm H_2SO_4 mehr gebraucht wurde, als zur Neutralisierung der zugefügten NaOH-Menge allein nötig gewesen wäre. Der Mehrbetrag von Säureverbrauch kann nur durch das Eiweiss bedingt worden sein. Es würde demnach das Eiweiss die Rolle einer Base spielen und Säure binden.

Nach etwa 10stündigem Stehen färbten sich die Mischungen rosa und nach etwa 30stündigem Stehen wieder deutlich rot, so dass ein erneuter Zusatz von rund 0,2 — 0,3 ccm H_2SO_4 zur Neutralisierung nötig wurde; d. h. es machte sich von neuem eine basische Wirkung des Eiweisses geltend. Weitere Beobachtungen wurden über die angegebene Zeit hinaus in dieser Hinsicht nicht mehr gemacht.

In der folgenden Versuchsreihe wurden die Mischungen mit Wasser verdünnt.

2. Versuchsreihe.

1. 5 E + 5,0 W[2]) + 1,0 NaOH brauchen 2,0 H_2SO_4
2. „ „ + 10,0 „ + 2,0 „ „ 3,0 „
3. „ „ + 15,0 „ + 3,0 „ „ 4,0 „
4. „ „ + 20,0 „ + 4,0 „ „ 5,0 „
5. „ „ + 25,0 „ + 5,0 „ „ 6,0 „

---

[1]) E = Eiereiweiss.

[2]) W = Wasser.

In dieser Versuchsreihe zeigt sich das gleiche Verhalten wie in der ersten; auch hier tritt eine Nachalkalisierung der Mischungen ein, die einen weiteren Säurezusatz von 0,2 bis 0,3 ccm H_2SO_4 erfordert. Verdünnung der Mischungen mit Wasser übt keinerlei Einfluss auf die chemische Reaktion aus.

B. Erwärmt auf 40^0 C.

3. Versuchsreihe.

1. 5 E + 5,0 W + 1,0 NaOH brauchen 2,0 H_2SO_4
2. „ „ + 10,0 „ + 2,0 „ „ 3,0 „
3. „ „ + 15,0 „ + 3,0 „ „ 4,0 „
4. „ „ + 20,0 „ + 4,0 „ „ 5,0 „
5. „ „ + 25,0 „ + 5,0 „ „ 6,0 „

Auch hier zeigt sich das gleiche Verhalten wie in den beiden vorher angeführten Versuchsreihen.

Fasse ich nun das Ergebnis der 3 vorstehenden Versuchsreihen zusammen, so komme ich zu folgendem Resultat:

Bringt man zu 5 ccm geklärten Hühnereiweisses bei Zimmertemparatur oder bei 40 — 50^0 C. 1 — 5 ccm 1 $^0/_0$iger NaOH, und titriert man diese Mischungen mit $^1/_4$-Normal-H_2SO_4, so braucht man zur Neutralisierung dieser alkalischen Mischungen mehr H_2SO_4, als die zugesetzte Menge NaOH erfordert, und zwar beträgt nach den obigen Versuchen der Mehrzusatz von H_2SO_4 im Anfang für 5 ccm Eiweïss ungefähr 1 ccm H_2SO_4. Nach längerem Stehen tritt wiederum eine basische Reaktion des Eiweisses hervor, und zwar in dem Masse, dass noch weitere 0,2 — 0,3 ccm H_2SO_4 gebunden werden.

Man kann hieraus schliessen, dass das Hühnereiweiss bei Zimmertemperatur oder nur gering erwärmt die Rolle einer Base spielt. Mit anderen Worten: Es bildet sich aus Hühnereiweiss, selbst wenn dies vorher mit Alkali versetzt worden ist, bei Zusatz von Säure in der Kälte oder bei geringer Erwärmung Acidalbuminat. Hiebei ist es für die Bildung dieses Acidalbuminats vollkommen gleichgültig, ob das Eiweiss rein oder mit Wasser verdünnt zur Verwendung kommt.

C. 3—4 Minuten auf 100° C. erhitzt; sofort nach dem Herausnehmen aus dem Glycerinbad titriert.

Zur Vermeidung kompakterer Gerinnung des Eiweisses beim Erhitzen und beim Titrieren wurde dasselbe in den beiden folgenden Versuchsreihen stark mit Wasser verdünnt.

4. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 NaOH + 50 W brauchen 1,0 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 2,0 „
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 3,0 „
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 4,0 „
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 5,0 „

Aus vorstehender Reihe geht zur Evidenz hervor, dass zur Neutralisierung der Mischungen gerade diejenige Menge Säure nötig war, welche die zugesetzte Menge NaOH erforderte. Hiebei erwies sich das Eiweiss als vollkommen indifferent.

Ich machte nun in der folgenden Reihe die gleichen Versuche, liess aber die Mischungen erkalten und titrierte dann erst. Hiebei kam ich zu folgendem Resultat:

D. Erhitzt auf 100° C.; nach dem Erkalten titriert.

5. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 NaOH + 50 W brauchen 1,0 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 2,0 „
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 2,7 „
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 3,6 „
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 4,6 „

In dieser Reihe stimmen die Resultate untereinander scheinbar nicht überein; während bei den ersten 2 Versuchen gerade soviel Säure verbraucht wurde, als die zugesetzte Menge NaOH erforderte, war bei den letzten 3 Versuchen weniger Säure nötig, als die Lauge für sich allein gebraucht hätte. Sehen wir aber von diesen ersten beiden Proben ab, so sprechen die Resultate dieser Reihe dafür, dass Hühnereiweiss beim Erhitzen mit NaOH auf 100° C. Alkali aufnimmt, d. h. dass sich Alkalialbuminat bildet.

Bei den bisherigen Versuchen habe ich zum Eiweiss stets zuerst die Natronlauge zugefügt und dann mit Säure titriert; ich hielt es jedoch für angezeigt, auch umgekehrt zu verfahren, d. h. erst Säure zum Eiweiss zuzusetzen und dann mit Natronlauge zu titrieren. Bisher war die Eiweiss-Natronlauge-Mischung mit Säure auf „Farblos“ titriert worden, nunmehr sollte die Eiweiss-Säure-Mischung mit Lauge auf „Rot“ titriert werden.

E. Bei Zimmertemperatur.

6. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 H_2SO_4 + 50 W brauchen 0,8 NaOH
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 1,7 „
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 2,7 „
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 3,7 „
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 4,7 „

In vorstehender Reihe habe ich fast durchweg 0,3 ccm Lauge weniger gebraucht, als die zugesetzte Säure erfordert hätte. Es musste deshalb ein Teil der Säure an das Eiweiss zur Bildung von Acidalbuminat herangetreten sein.

F. Erhitzt auf 100° C. und nach dem Erkalten titriert.

7. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 H_2SO_4 + 50 W brauchen 0,4 NaOH
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 1,8 „
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 2,7 „
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 3,2 „
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 4,4 „

Das Resultat ist das gleiche wie in der 6. Versuchsreihe, es ist weniger Lauge gebraucht worden, als die Säure allein verlangt haben würde. Höchst wahrscheinlich wird ein Teil der Säure zur Bildung von Acidalbumin sehr fest an das Eiweiss gebunden. Diese Säuremenge variiert in den einzelnen Proben von 0,2 bis 0,8 ccm.

Eine vergleichende Betrachtung sämtlicher Versuchsreihen führt uns zu folgenden Schlüssen:

Hühnereiweiss bindet bei Zimmertemperatur eher Schwefelsäure als Natronhydrat, auch dann noch, wenn eine Lösung von Eiweiss in Natronlauge mit Schwefelsäure versetzt wird. Eiweiss und Natronlauge bilden, zusammen auf 100° C. erhitzt, Natronalbuminat.

Diesem Albuminat wird in der Hitze durch Schwefelsäure das Alkali völlig entzogen; in der Kälte scheint es dagegen einen Teil des Alkalis festhalten zu können.

Hühnereiweiss bildet, mit Schwefelsäure zusammengebracht, sowohl in der Kälte wie bei 100°C. ein Acidalbumin, das der Natronlauge gegenüber beständig erscheint; ein Teil der Säure lässt sich wenigstens durch Titration mit Natronlauge nicht mehr nachweisen.

II. Kalireihe.

Die Versuche dieser Reihe wurden in gleicher Weise angestellt wie die der Natronreihe. Die hiezu verwendete 1%ige Kalilauge stand, wie sie sollte, derart ein, dass 1,0 ccm dieser Lauge 0,71 ccm der $^1/_4$-Normalschwefelsäure neutralisierte.

A. Bei Zimmertemperatur.

8. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 KOH brauchen 1,6 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ „ 2,3 „
3. „ „ + 3,0 „ „ 3,0 „
4. „ „ + 4,0 „ „ 3,7 „
5, „ „ + 5,0 „ „ 4,4 „

Das Resultat dieser Reihe kommt dem der entsprechenden Natronreihe fast gleich. Auch hier wird mehr Säure gebraucht, als anzunehmen wäre, jedoch um 0,1 ccm weniger wie bei der Natronlauge. Nach 12stündigem Stehen färben sich die neutralisierten Mischungen wiederum rot, d. h. sie werden wieder alkalisch. Diese nachträglich auftretende Alkalescenz macht noch einen weiteren Säurezusatz von 0,2—0,4 ccm notwendig.

9. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 KOH + 5 W brauchen 1,6 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ + 10 „ „ 2,3 „
3. „ „ + 3,0 „ + 15 „ „ 3,0 „
4. „ „ + 4,0 „ + 20 „ „ 3,7 „
5. „ „ + 5,0 „ + 25 „ „ 4,4 „

Vorstehendes Resultat kommt dem der entsprechenden Natronreihe vollkommen gleich.

B. Erwärmt auf 40° C.

10. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 KOH + 5 W brauchen 1,6 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ + 10 „ „ 2,3 „
3. „ „ + 3,0 „ + 15 „ „ 3,0 „
4. „ „ + 4,0 „ + 20 „ „ 3,7 „
5. „ „ + 5,0 „ + 25 „ „ 4,4 „

Auch dieses Resultat entspricht dem der gleichen Natronreihe.

C. Erhitzt auf 100° C. und heiss titriert.

11. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 KOH + 50 W brauchen 0,7 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 1,3 „
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 2,0 „
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 2,9 „
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 3,5 „

Abgesehen von der ganz geringen Differenz von 0,1 ccm bei der 2., 3. und 4. Probe ist auch dieses Resultat dem der entsprechenden Natronreihe ganz gleich.

D. Erhitzt auf 100° C. und nach dem Erkalten titriert.

12. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 KOH + 50 W brauchen 1,0 H_2SO_4
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 1,7 „
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 2,1 „
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 2,8 „
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 3,4 „

In dieser Reihe lässt sich im Gegensatze zu allen übrigen eine gewisse Gesetzmässigkeit nicht erkennen; während bei den Proben 1 und 2 mehr Säure nötig war, als die zugesetzte Menge KOH hätte gebrauchen sollen, neutralisierten sich die Mischungen 3 und 4 in dem richtigen Verhältnis. Nur Probe 5 lieferte das gleiche Resultat wie die entsprechenden Proben in der Natronreihe; man darf aber wegen dieses einen zutreffenden Versuches jedenfalls nicht behaupten, dass sich die KOH ebenso verhalte wie die NaOH. Ich komme vielmehr zu der Annahme, dass die KOH beim Erhitzen mit Hühnereiweiss dem letzteren gegenüber kein so konstantes Verhalten und keine solche Neigung zur chemischen Vereinigung zeigt wie die NaOH, zumal auch in der vorhergehenden Reihe schon gewisse, wenn auch nur ganz geringe, Abweichungen von der bisherigen Gesetzmässigkeit zu verzeichnen waren.

E. Bei Zimmertemperatur.

13. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 H_2SO_4 + 50 W brauchen 1,1 KOH (0,2)
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 2,3 „ (0,4)
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 3,4 „ (0,6)
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 4,8 „ (0,6)
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 6,4 „ (0,5).

Vorstehende Reihe gibt Anlass zu einigen Bemerkungen:

Ich habe z. B. bei Probe 1 zur Neutralisierung der Mischung von 5 ccm E + 1,0 ccm H_2SO_4 1,1 ccm KOH gebraucht. Nun neutralisiert 1,0 ccm KOH 0,71 ccm H_2SO_4, folglich 1,1 ccm KOH $1,1 \times 0,71 = 0,78$ ccm H_2SO_4.

Da nun die Eiweiss - Säure - Mischung 1 ccm Schwefelsäure enthielt und gleichwohl schon nach Bindung von nur 0,78 ccm Säure an Kali neutrale Reaktion zeigte, so muss die Differenzmenge von $1,0 - 0,78 = 0,2$ ccm H_2SO_4 an das Eiweiss übergegangen sein.

Die in Klammern beigefügten Zahlen, welche ich durch obige Rechnung gefunden habe, deuten die Menge der an das Eiweiss übergegangenen Säure in ccm an. Dies gilt auch für die eingeklammerten Zahlen der nächsten Reihe. Es ist demnach das Resultat dieser Reihe analog dem der entsprechenden Natronreihe.

F. Erhitzt auf 100° C. und nach dem Erkalten titriert.

14. Versuchsreihe.

1. 5 E + 1,0 H_2SO_4 + 50 W brauchen 0,8 KOH (0,4)
2. „ „ + 2,0 „ + 50 „ „ 2,0 „ (0,6)
3. „ „ + 3,0 „ + 50 „ „ 3,5 „ (0,5)
4. „ „ + 4,0 „ + 50 „ „ 4,8 „ (0,6)
5. „ „ + 5,0 „ + 50 „ „ 6,3 „ (0,5).

Auch die letzte Reihe fällt ebenso aus wie die entsprechende Natronreihe.

Überblickt man das Resultat sämtlicher Kalireihen, so bieten sie im wesentlichen die gleichen Erscheinungen wie die Natronreihen; nur kann man aus ersteren schliessen, dass das Kalialbuminat leichter durch Säure zerlegt wird als das Natronalbuminat.

Die Ergebnisse aller bisherigen Versuche glaube ich folgendermassen zusammenfassen zu können:

1. Frisches Hühnereiweiss verhält sich verdünnter Schwefelsäure gegenüber wie ein Alkali; es bindet bei Zimmertemperatur Säure, sowohl wenn die Säure direkt dem Eiweiss zugefügt, als auch wenn eine Mischung von Eiweiss und Natron- oder Kalilauge mit Säure versetzt wird.

2. Wird Eiweiss mit verdünnter Schwefelsäure auf 100°C erhitzt, so hält das Eiweiss einen Teil der Säure so fest, dass er ihm durch Alkali nicht entzogen werden kann (Bildung von Acidalbumin).

3. Fügt man zu einer Mischung von Eiweiss und Alkalilauge bei Zimmertemperatur verdünnte Schwefelsäure, so wird das Alkali sogleich vollständig an die Säure gebunden.

4. Erhitzt man Eiweiss mit Alkalilauge auf 100°C., so entsteht ein Alkalialbuminat, dem das

Alkali durch verdünnte Schwefelsäure bei Zimmertemperatur nur zum Teil, bei Siedehitze aber vollständig entzogen werden kann.

II. Darstellung von starrem Alkalialbuminat.

Um Schaumbildung bei der Mischung von Eiweiss, Lauge und Wasser zu vermeiden, und um ein von Trübungen und leichten flockigen Ausscheidungen freies Albuminat zu erhalten, wählte ich folgendes Verfahren:

Ich beschickte immer zu gleicher Zeit 4 kleine Bechergläschen mit je 7 ccm Eiweiss, 1 — 4 ccm Alkalilauge und 1 — 4 ccm Wasser. Dann liess ich die Mischungen eine halbe bis eine ganze Stunde stehen und rührte sie währenddem öfters mit dem Glasstabe um. Hierauf erst goss ich den Inhalt in Reagensgläschen über, liess jedoch den letzten Rest (etwa 2 ccm) im Becherglase zurück. Es gelang mir dadurch nicht nur eine innigere Durchmischung der einzelnen Bestandteile, sondern ich erhielt auch niemals einen Bodensatz im Reagensgläschen. Wenn auch schon Rosenthal und Schulz auf den erwähnten Übelstand bei Bereitung ihres Nährbodens aufmerksam gemacht und vor Umschütteln des Gemenges im Reagensgläschen gewarnt haben, so glaubte ich doch das obige Verfahren als sehr zweckentsprechend erwähnen zu dürfen. Die so beschickten Reagensgläschen wurden dann je 3 — 4 Minuten im Glycerinbad auf 100° C. erhitzt.

Ich gehe nun zur Besprechung der Versuche selbst über.

I. Natronreihe.

7 E + 1,0 NaOH	1,0 W	Opalisierend, durchscheinend, fest,
	2,0 „	desgleichen,
	3,0 „	opalisierend, besser durchscheinend, fest,
	4,0 „	fast durchsichtig, nicht mehr fest genug.

7 E + 1,1 NaOH	1,0 W	Opalisierend, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	desgleichen,
	2,5 „	opalisierend, dickflüssig.
7 E + 1,2 NaOH	1,0 W	Etwas wolkig, durchscheinend, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	gut durchscheinend, fest,
	2,5 „	gut durchscheinend, nicht fest genug.
7 E + 1,3 NaOH	1,0 W	Stark opalisierend, durchscheinend, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	weniger opalisierend, durchscheinend, weniger fest,
	2,5 „	gallertig, durch Luftblasen zerrissen.
7 E + 1,4 NaOH	1,0 W	Gering opalisierend, gut durchscheinend, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	fast nicht opalisierend, beinahe durchsichtig, fest,
	2,5 „	fast nicht opalisierend, nicht mehr fest genug.
7 E + 1,5 NaOH	1,0 W	Etwas opalisierend, durchsichtig, fest,
	2,0 „	etwas opalisierend, weniger fest, aber noch brauchbar,
	3,0 „	etwas opalisierend, dickflüssig,
	4,0 „	desgleichen.
7 E + 1,6 NaOH	1,0 W	Noch weniger opalisierend, durchsichtig, fest,
	2,0 „	desgleichen,
	3,0 „	durchsichtig, weniger fest,
	4,0 „	durchsichtig, dickflüssig.
7 E + 1,7 NaOH	1,0 W	Gering opalisierend, gut durchsichtig, fest,
	2,0 „	desgleichen,
	3,0 „	gering opalisierend, ganz durchsichtig, dickflüssig,
	4,0 „	gering opalisierend, ganz dünnflüssig.

7 E + 1,8 NaOH	1,0 W	Fast nicht opalisierend, gut durchsichtig, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	durchsichtig, weniger fest, aber noch brauchbar,
	2,5 „	durchsichtig, weniger fest, nicht brauchbar.
7 E + 1,9 NaOH	1,0 W	Nicht opalisierend, gut durchsichtig, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	nicht opalisierend, weniger fest, noch brauchbar,
	2,5 „	desgleichen.
7 E + 2,0 NaOH	1,0 W	Etwas opalisierend, fast durchsichtig, fest,
	1,5 „	etwas opalisierend, gut durchsichtig, fest,
	2,0 „	durchsichtig, weniger fest, noch brauchbar,
	2,5 „	durchsichtig, nicht mehr fest genug.

Sämtliche aufgeführten Proben zeigen nach dem Erhitzen keine Gelbfärbung.

7 E + 3,0 NaOH ganz fest, opalisierend, wenig durchscheinend.

7 E + 4,0 NaOH ganz durchsichtig und fest mit einem Stich ins Gelbe.

7 E + 5,0 NaOH glashell, vollständig durchsichtig, bernsteingelb.

Ein Zusatz von weniger als 1,0 ccm NaOH zu 7 ccm E würde nicht genügen, um eine auch nur schwach durchscheinende Gallerte zu erzielen. Deshalb wurde gleich mit einem Zusatz von 1,0 NaOH begonnen.

Aus der obigen Versuchsreihe ergibt sich für die Herstellung eines Eiweissnährbodens mit 1$^0/_0$iger Natronlauge und Wasser folgendes Resultat. Während bei einem Zusatze bis zu einer Menge von 1,4 ccm NaOH nicht die genügende Durchsichtigkeit der Gallerte erzielt wird, kann andererseits bis zu 2,0 ccm Wasser zugegeben werden, ohne dass ein genügendes Festwerden beim Erhitzen verhindert würde. Ein Zusatz von mehr als 2,0 ccm NaOH ist für den vorliegenden Zweck unthunlich, da das Alkali leicht eine Zersetzung des Eiweisses bewirkt, welche durch die Gelbfärbung des Albuminats beim Erhitzen angezeigt wird. Bei einem Zusatze von 1,5—2,0 ccm $1^{0}/_{0}$ NaOH, sowie von 1,0—2,0 ccm W zu 7 ccm E wären alle diejenigen Bedingungen bezüglich Durchsichtigkeit und Festigkeit erfüllt, wie man sie von einem festen Nährboden verlangt. Da es aber darauf ankommt, einen Eiweissnährboden mit möglichst geringem Alkaligehalt herzustellen, so wäre in den angegebenen Grenzen die passendste Zusammensetzung

$$7\ \mathrm{E} + 1{,}8\ \mathrm{NaOH}\ 1^{0}/_{0} + 1{,}5\ \mathrm{W}.$$

Eine äusserst geringe Opaleszenz zeigt sich an dieser Mischung nach dem Erstarren nur im auffallenden Lichte.

II. Kalireihe.

7 E + 1,0 KOH	1,0 W	Marmorartig, undurchsichtig, fest,
	2,0 „	desgleichen,
	3,0 „	stark opalisierend, undurchsichtig, dickflüssig,
	4,0 „	desgleichen.
7 E + 1,1 KOH	1,0 W	Stark opalisierend, wenig durchscheinend, fest,
	2,0 „	desgleichen,
	3,0 „	weniger opalisierend, etwas durchscheinend, dünnflüssig,
	4,0 „	desgleichen.
7 E + 1,2 KOH	1,0 W	Wolkig getrübt, nicht durchscheinend, fest,
	1,5 „	stark opalisierend, etwas durchscheinend, fest,
	2,0 „	stark opalisierend, etwas durchscheinend, nicht fest genug,
	2,5 „	stark opalisierend, etwas durchscheinend, dickflüssig.

7 E + 1,3 KOH	1,0 W	Fast marmorartig, kaum durchscheinend, fest,
	1,5 „	stark opalisierend, schwach durchscheinend, fest,
	2,0 „	stark opalisierend, etwas weniger fest, mehr durchscheinend,
	2,5 „	stark opalisierend, etwas mehr durchscheinend, dickflüssig.
7 E + 1,4 KOH	1,0 W	Stark opalisierend, durchscheinend, fest,
	1,5 „	stark opalisierend, besser durchscheinend, fest,
	2,0 „	weniger opalisierend, mehr durchscheinend, fest,
	2,5 „	fast durchsichtig, dickflüssig.
7 E + 1,5 KOH	1,0 W	Opalisierend, durchscheinend, fest,
	1,5 „	„ , besser „ „
	2,0 „	desgleichen,
	2,5 „	weniger opalisierend, durchscheinend, nicht fest genug.
7 E + 1,6 KOH	1,0 W	Wenig opalisierend, durchscheinend, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	wenig opalisierend, fast durchsichtig, fest,
	2,5 „	durchsichtig, nicht fest genug.
7 E + 1,7 KOH	1,0 W	Fast nicht opalisierend, durchsichtig, fest,
	2,0 „	fast nicht opalisierend, besser durchsichtig, fest,
	3,0 „	vollkommen durchsichtig, nicht fest genug,
	4,0 „	desgleichen.

7 E + 1,8 KOH	1,0 W	Gut durchsichtig, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	gut durchsichtig, gallertähnlich, noch fest genug,
	2,5 „	gut durchsichtig, dickflüssig.

7 E + 1,9 KOH	1,0 W	Etwas opalisierend, durchsichtig, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	etwas opalisierend, weniger fest, noch brauchbar,
	2,5 „	schwach opalisierend, dickflüssig.

7 E + 2,0 KOH	1,0 W	Schwach opalisierend, durchsichtig, fest,
	1,5 „	desgleichen,
	2,0 „	schwach opalisierend, weniger fest, noch brauchbar,
	2,5 „	schwach opalisierend, dickflüssig.

Sämtliche Proben dieser Kalireihe zeigen keine Gelbfärbung.

7 E + 3,0 KOH glashell, schwach gelblich, fest.

7 E + 4,0 KOH } glashell, deutlich gelb gefärbt, fest.
7 „ + 5,0 „ }

Auch bei Kalilauge genügt ein Zusatz von weniger als 1,0 ccm nicht, um ein auch nur schwaches Durchscheinen der Eiweissgallerte zu bewirken. Andererseits tritt bei Zusatz von mehr als 3,0 ccm KOH schon Zersetzung des Eiweisses (Gelbfärbung) ein. Während bei der Natronreihe schon ein Zusatz von 1,5 ccm NaOH ausreicht, um eine genügende Durchsichtigkeit zu erzielen, ist letztere in der Kalireihe erst bei einem Zusatz von 1,7 ccm KOH herbeizuführen. Bezüglich der zuzusetzenden Wassermenge gilt bei den Kalimischungen das Gleiche wie bei den Natronmischungen.

Die entsprechenden Grenzen der zuzusetzenden Kalilauge und Wassermenge wären nach vorstehender Reihe 1,7—2,0 ccm KOH $1^0/_0$, sowie 1,0 — 2,0 ccm W. und die beste Zusammensetzung für einen Kalialbuminatnährboden

7 E + 1,8 KOH $1^0/_0$ + 1,5 W.

Wir wissen, dass die meisten Nährböden, bevor sie zu Züchtungsversuchen verwendet werden, zu sterilisieren sind. Man muss sie daher mehrmals auf 70 — 90° C. erhitzen können, ohne dass ihre Konsistenz und Durchsichtigkeit beeinträchtigt wird.

Ein zweimaliges 5 Minuten langes Erhitzen meiner brauchbarsten Proben auf 90 — 95° C. (im Glycerinbad) zog augenscheinlich keinerlei Veränderung bezüglich ihrer Konsistenz und Durchsichtigkeit nach sich.

Um den Prozentgehalt des freien, oder genauer, des durch Säure nachweisbaren Alkalis in den für Nährböden brauchbaren Mischungen zu bestimmen, stellte ich die unten benannten Mischungen in gleicher Weise, wie früher beschrieben, her, erhitzte sie aber im Becherglase. Nach dem Erkalten rührte ich die Gallerte mit einem Glasstabe unter stetem Zusatz von Wasser gut um, bis dieselbe im Wasser möglichst fein verteilt war. Dann titrierte ich mit $^1/_4$-Normalschwefelsäure, wobei ich wiederum Phenolphtalein als Indikator benützte.

Das Ergebnis der Titrationen war folgendes:

a) Für Natronalbuminat.

1. 7 E + 1,0 W + 1,7 NaOH brauchen 1,1 H_2SO_4
2. „ „ + 1,0 „ + 1,8 „ „ 1,2 „
3. „ „ + 1,5 „ + 1,8 „ „ 1,2 „
4. „ „ + 2,0 „ + 1,9 „ „ 1,3 „
5. „ „ + 1,5 „ + 2,0 „ „ 1,4 „
6. „ „ + 2,0 „ + 2,0 „ „ 1,4 „

Wählen wir z. B. die Probe 1, um an ihr den Gehalt des Albuminats an nachweisbarem Alkali zu berechnen, so finden wir

in $7 + 1 + 1{,}7 = 9{,}7$ ccm Mischung 1,1 ccm nachweisbare 1$^0/_0$ige NaOH;

oder: 9,7 ccm Mischung enthalten 0,011 g NaOH, also enthalten 100 ccm Mischung

$0{,}011 \times (100 : 9{,}7) = 0{,}11$ g NaOH, d. h. 7 E + 1,0 W + 1,7 NaOH enthalten 0,11$^0/_0$ NaOH.

Berechnet man den Prozentgehalt auf diese Weise auch für die anderen Mischungen mit Natronlauge, so ergibt sich:

7 E + 1,0 W + 1,8 NaOH enthalten 0,11 $^0/_0$ NaOH
„ „ + 1,5 „ + 1,8 „ „ 0,11 „ „
„ „ + 2,0 „ + 1,9 „ „ 0,12 „ „
„ „ + 1,5 „ + 2,0 „ „ 0,13 „ „
„ „ + 2,0 „ + 2,0 „ „ 0,13 „ „

b) Für Kalialbuminat.

1. 7 E + 1,0 W + 1,7 KOH brauchen 1,1 H_2SO_4
2. „ „ + 1,0 „ + 1,8 „ „ 1,2 „
3. „ „ + 1,5 „ + 1,8 „ „ 1,2 „
4. „ „ + 1,5 „ + 1,9 „ „ 1,3 „
5. „ „ + 1,0 „ + 2,0 „ „ 1,4 „
6. „ „ + 1,5 „ + 2,0 „ „ 1,4 „

Den Prozentgehalt an nachweisbarem KOH berechnet man, wie folgt: 7 E + 1,0 W + 1,7 KOH = 9,7 ccm Mischung enthalten soviel KOH, als 1,1 ccm H_2SO_4 entspricht.

0,71 ccm H_2SO_4 entsprechen 1 ccm KOH
0,71 „ „ „ 0,01 g „
1,0 „ „ „ 0,01 : 0,71 g KOH
1,1 „ „ „ $1,1 \times (0,01 : 0,71) = 0,0155$ KOH.

Demnach sind in 9,7 ccm Mischung 0,0155 g KOH enthalten, und

in 100 ccm $\frac{100}{9,7} \times 0,0155 = 0,16$ g; also: 7 E + 1,0 W + 1,7 KOH enthalten 0,16 $^0/_0$ KOH.

Für die weiteren Kalialbuminatproben finden wir durch gleichartige Berechnung:

7 E + 1,0 W + 1,8 KOH enthalten 0,17 $^0/_0$ KOH
„ „ + 1,5 „ + 1,8 „ „ 0,17 „ „
„ „ + 1,5 „ + 1,9 „ „ 0,18 „ „
„ „ + 1,0 „ + 2,0 „ „ 0,19 „ „
„ „ + 1,5 „ + 2,0 „ „ 0,19 „ „

III. Darstellung von Nährböden aus Alkalialbuminat unter Zusatz von Kochsalz, Nährbouillon, Traubenzucker, Glycerin und Pepton.

Bevor ich mich den in der Überschrift erwähnten Darstellungen zuwende, muss ich noch einmal auf den zweiten

Abschnitt meiner Arbeit zurückgreifen. Am Schlusse desselben habe ich eine Vorschrift angegeben, die besagt, in welchem Verhältnis man zum Eiweiss Natron- und Kalilauge zugeben muss, um ein brauchbares Alkalialbuminat zu erhalten. Dieses Verhältnis bleibt aber, wie die Versuche zu dem letzten Abschnitte ergeben haben, nicht konstant. Während ich bei den Versuchen im zweiten Abschnitt gefunden habe, dass man schon mit einem Zusatz von 1,8 — 2,0 ccm 1 $^0/_0$iger Natron- oder Kalilauge zu 7 ccm Eiweiss brauchbare Alkalialbuminate erhält, haben die Versuche dieses Abschnittes ergeben, dass zur Darstellung von brauchbaren Alkalialbuminaten eine grössere Menge Alkalis zugesetzt werden musste, als bei den früheren Versuchen nötig war, und zwar für beide Alkalien 2,2 — 2,4 ccm zu 7 ccm Eiweiss. Dies findet wohl die einfachste Erklärung darin, dass ich bei den früheren Versuchen ganz frisch gelegte Eier aus einer bestimmten Gegend meines Wohnsitzes zur Verfügung hatte, während ich späterhin Eiweiss von Eiern verschiedener Herkunft und verschiedenen Alters verwendete, mit anderen Worten, dass das Eiweiss von Hühnereiern verschiedener Herkunft und verschiedenen Alters, wahrscheinlich auch verschiedener Jahreszeiten, den Alkalien gegenüber sich ungleich verhält.

Hieraus ergibt sich, dass bei jeder Eiweissart, die zur Bereitung von glasig erstarrtem Albuminat verwendet werden soll, vorher die Menge des zuzufügenden Alkalis ausprobiert werden muss. Es ist durchaus notwendig, diese Vorprüfung anzustellen, wenn die Darstellung von brauchbaren Eiweissnährböden ohne Zeitverlust gelingen soll. Das jedoch hat sich bei allen meinen Versuchen durchweg gezeigt, dass, falls das Eiweiss nicht auf sein doppeltes Volumen aufgefüllt wurde, der Zusatz von Alkalien geringer sein durfte, als ihn Rosenthal und Schulz seinerzeit angegeben haben.

Nunmehr gehe ich zur Darstellung der Eiweissnährböden selbst über. Allen Nährböden wurden die in der Überschrift genannten Stoffe annähernd in den Verhältnissen zugefügt, die sich in der bakteriologischen Praxis als zweckmässig erwiesen haben.

a) Kochsalzlösung.

7 E + 1,0 ccm wässriger NaCl-Lösung von 6%.	2,2	NaOH	fast durchsichtig, nicht fest genug,
	2,3	„	ganz durchsichtig und fest,
	2,4	„	desgleichen.
	2,2	KOH	gleitende Gallerte, nicht genügend durchsichtig,
	2,3	"	" " " " "
	2,4	"	" " " " "
	2,5	"	" " " " "
	2,6	"	" " " " "
	2,7	"	" " " " "
	2,8	„	ganz durchsichtig und fest,
	2,9	"	" " " "
	3,0	"	" " " "

Vorstehende Versuchsreihe führt uns zu folgender Betrachtung: Zunächst bedingt der Zusatz von Kochsalzlösung einen erhöhten Alkalizusatz, welcher besonders bei der Kalilauge hervortritt, nämlich für Natronlauge 0,1 — 0,2 ccm, für Kalilauge 0,4 — 0,5 ccm. Dann aber wird die Konsistenz des Nährbodens durch Zusatz von Kochsalzlösung stark beeinträchtigt; ein Umstand, den auch E. Geissler[1]) erwähnt hat.

b) Kochsalz in Nährbouillon gelöst.

7 E + 1,0 ccm NaCl-Bouillonlösung von 6%.	2,3	NaOH	ganz durchsichtig, fest,
	2,4	"	" " "
	2,5	"	" " "
	2,7	KOH	opalisierend, gut durchscheinend, fest,
	2,8	„	ganz durchsichtig, fest,
	2,9	"	" " "
	3,0	"	" " "

Abgesehen von einer ganz schwachen Gelbfärbung, welche die Proben infolge des Zusatzes von Nährbouillon annehmen, zeigen sich in dieser Reihe die gleichen Verhältnisse wie in der vorhergehenden.

---

[1]) E. Geissler, Inaugural-Diss. Erlangen 1889.

c) Wässerige Kochsalz-Traubenzuckerlösung mit 3 $^0/_0$ NaCl und 5 $^0/_0$ Traubenzucker.

7 E + 2,0 ccm K.T.L.[1]	2,3	NaOH gut durchsichtig, nicht fest genug,
	2,4	„ „ „ „ „ „
	2,5	„ „ „ „ „ „
	2,7	KOH stark opalisierend, etwas durchscheinend,
	2,8	„ gut durchsichtig, dickflüssig,
	2,9	„ „ „ „
	3,0	„ „ „ „

In dieser Reihe tritt der Einfluss von NaCl auf die Konsistenz der Proben ebenso deutlich hervor wie in der Reihe a). Die Proben waren sämtlich schwach gelb gefärbt, welche Erscheinung wohl der Wirkung des Alkalis auf den Traubenzucker zugeschrieben werden kann.

Zur Erzielung der richtigen Konsistenz wurden die 4 letzten Proben der vorstehenden Reihe wiederholt hergestellt, hiebei aber anstatt 2,0 ccm nur 1,5 ccm der K. T. L. zugesetzt und so folgendes Resultat erzielt.

7 E + 1,5 ccm K.T.L.	2,7	KOH nicht ganz durchsichtig, fest,
	2,8	„ ganz durchsichtig, fest,
	2,9	„ „ „ „
	3,0	„ „ „ „

d) Wässerige Glycerin-Kochsalzlösung mit 50 $^0/_0$ Glycerin und 6 $^0/_0$ NaCl.

7 E + 1,5 ccm G.K.L.[2]	2,3	NaOH glashell, fest,
	2,4	„ „ „
	2,5	„ „ „
	2,7	KOH „ „
	2,8	„ „ „
	2,9	„ „ „
	3,0	„ „ „

---

[1] K.T.L. = Kochsalz-Traubenzucker-Lösung.

[2] G.K.L. = Glycerin-Kochsalz-Lösung.

Während sowohl Kochsalz allein wie auch Traubenzucker die Durchsichtigkeit der Albuminate derart beeinträchtigt, dass ein erhöhter Zusatz von Alkalien zu denselben nötig wird, erhöht Glycerin ihre Durchsichtigkeit derart, dass sie in Bezug auf letztere der Nährgelatine vollkommen gleich stehen; auch wird durch Zusatz von Glycerin eine sehr schöne glatte Oberfläche des erstarrten Albuminates erzielt.

e) Pepton.

Im Gegensatz zu Glycerin, Traubenzucker und Kochsalz liess sich bei Zusatz von Pepton mit Ausnahme von 2 Proben kein gut durchsichtiger Nährboden erzielen. Mehrere Versuchsreihen, welche der Vollständigkeit halber unten angeführt werden, ergaben fast durchweg die gleichen ungünstigen Resultate, und ich glaube mich dahin aussprechen zu können, dass sich die bekannten Handelsmarken des Peptons als Zusatz zu Alkalialbuminaten nicht so gut eignen wie die vorhergenannten Präparate. Es mag weiteren noch anzustellenden Versuchen anheim gestellt sein, in dieser Hinsicht nähere Erfahrungen zu gewinnen.

1. Wässerige Pepton-Kochsalzlösung mit 10 % Pepton Witte u. 6 % NaCl.

7 E + 1,5 ccm P.K.L.1)	2,3	NaOH	undurchsichtig,	fest,
	2,4	„	„	„
	2,5	„	„	„
	2,6	„	„	„
	2,7	„	„	„
	2,8	„	gut durchsichtig,	fest,
	2,9	„	„ „	„
	2,7	KOH	undurchsichtig,	fest,
	2,8	„	„	„
	2,9	„	„	„
	3,0	„	„	„
	3,1	„	„	„
	3,2	„	„	„

---

1) P.K.L. = Pepton-Kochsalz-Lösung.

7 E + 1,5 ccm P.K.L.	3,3	KOH	undurchsichtig,	dickflüssig,
	3,4	„	„	„
	3,5	„	„	„
	3,6	„	„	„

2. Wässerige Pepton-Kochsalzlösung

mit 5 $^{0}/_{0}$ Peptonum siccum alcohole praecipitatum Grübler
und 3 $^{0}/_{0}$ NaCl.

7 E + 2,0 ccm P.K.L.	2,2	NaOH	undurchsichtig,	fest,
	2,3	„	„	„
	2,4	„	„	„
	2,5	„	„	„
	2,6	„	„	„
	2,7	„	undurchsichtig,	dickflüssig,
	2,8	„	„	„
	2,9	„	„	„
	3,0	„	„	„

3. Dasselbe mit Zusatz von Wasser.

7 E + 0,5 P.K.L. + 1,0 W.	2,6	NaOH	etwas durchscheinend,	fest,
	2,8	„	„ „	„
	3,2	KOH	undurchsichtig,	dickflüssig,
	3,4	„	„	„

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit lassen sich in Folgendem zusammenfassen:

Aus Hühnereiweiss lässt sich stets durch Zusatz von Alkalien und Wasser ein starres durchsichtiges Alkalialbuminat herstellen, wenn man die Mischung auf etwa 98° C. 3—4 Minuten lang erhitzt.

Die einzelnen Eiweissarten müssen, wenn man ein für Nährböden brauchbares Alkalialbuminat erhalten will, stets auf den nötigen Zusatz von Alkali (NaOH oder KOH) ausprobiert werden.

Zusatz von Kochsalz erweicht die Konsistenz des Alkalialbuminates und beeinträchtigt die Durchsichtigkeit desselben, so dass ein vermehrter Zusatz von Alkali zu dem herzustellenden Nährboden nötig wird, und zwar bei 7 ccm E für Natronlauge 0,1 — 0,2 ccm, für Kalilauge 0,4 — 0,5 ccm.

Das letztere gilt auch, allerdings in wesentlich geringerem Grade, von Traubenzucker.

Traubenzucker und Nährbouillon bewirken schwache Gelbfärbung der Alkalialbuminate.

Zusatz von Glycerin erzeugt die beste Durchsichtigkeit und Konsistenz.

Die gewöhnlichen Peptone bewähren sich als Zusatz zu Alkalialbuminat-Nährböden nicht.

Um nun zum Schlusse eine definitive Vorschrift für die Herstellung von Eiweissnährböden zu geben, schildere ich im Folgenden das hiebei anzuwendende Verfahren, selbst auf die Gefahr hin, Dinge zu wiederholen, auf die bereits schon Rosenthal und Schulz hingewiesen haben.

Will man z. B. 30 Reagensgläser beschicken, so nehme man 10 — 12 Eier, trenne die Dotter vom Eiweiss, bringe letzteres auf eine zweifache Lage Musselin und presse es unter gelindem Drucke der Hand durch das Musselinfilter. Hierauf bringe man das so filtrierte und von seinen Chalazen befreite Eiweiss in einen Messcylinder und lasse es in demselben über Nacht stehen. Tags darauf giesse man es unter Zurücklassung des Bodensatzes in ein anderes Gefäss und verwende es wie folgt:

Man bringt 7 ccm des Eiweisses aus einer in Zehntelcubikcentimeter geteilten Bürette in ein Becherglas, fügt 1,5 ccm Wasser und 2,0 ccm 1 %iger Natron- oder Kalilauge hinzu. Dieses Gemisch lässt man im Becherglase unter wiederholtem Umrühren mit dem Glasstabe mindestens eine halbe Stunde stehen, bringt es dann unter Zurücklassung eines kleinen trüben Restes in ein Reagensglas und legt das Glas für 3 — 4 Minuten schräg in ein vorher auf 100° C. erhitztes flaches Glycerinbad. Man wird nun an der Konsistenz sowie an der grösseren oder geringeren Durchsichtigkeit der Gallerte ersehen, ob der Zusatz von 2,0 ccm Lauge zu gross, zu gering oder gerade genügend war, und wird eine zweite und dritte Probe, falls sie notwendig erscheinen sollten, dementsprechend variieren. Hat man auf diese Weise den für das zu verwendende Eiweiss erforderlichen Zusatz von Alkali ermittelt, so versetzt man die ganze noch vorhandene Eiweissmenge mit dem entsprechenden Quantum von Natron- oder Kalilauge und Wasser, füllt die Mischung in Reagensgläser über und bringt die Füllung der Röhrchen im Glycerinbade zur Erstarrung.

Wünscht man nun bei der Verwendung des Alkalialbuminates als Eiweissnährboden dem Eiweiss noch Traubenzucker oder Kochsalzlösung hinzuzusetzen, so muss man, wie ich im letzten Abschnitt gefunden habe, bei Natronalbuminat noch 0,1 bis 0,2 ccm $1\,^0/_0$iger NaOH, bei Kalialbuminat 0,4 — 0,5 ccm $1\,^0/_0$iger KOH mehr hinzufügen, als man bei Abwesenheit von Traubenzucker oder Kochsalz nötig hätte.

Diese Mischung wird in einem mit Wattepfropfen verschlossenen Reagensglase in vorher beschriebener Weise auf 100° C. erhitzt und kann dann am 2. und am 3. Tage durch Erwärmen auf 90° C. sterilisiert werden.

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt im Sommersemester 1894 im physiologischen Institut der Universität Erlangen.

Ich erfülle noch die angenehme Pflicht, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. Rosenthal, für die Anregung zu vorliegender Arbeit meinen besten Dank auszusprechen. Besonderen Dank aber bin ich dem I. Assistenten Herrn Dr. O. Schulz abzustatten verpflichtet für das liebenswürdige Entgegenkommen und die jederzeit bereitwilligst gewährte Unterstützung, welche mir derselbe bei Durchführung vorliegender Arbeit hat angedeihen lassen.

Literatur.

1. „Biologisches Centralblatt.“ Sonderabdruck aus Bd. VIII, Nr. 10, 15. Juli 1888.

2. Flügge, „Mikroorganismen“, 2. Auflage. Leipzig 1886.

3. Geissler, „Beiträge zur Kenntnis des Hühnereiweisses.“ Inaug.-Diss. Erlangen 1889.

4. Heim, „Lehrbuch der bakteriologischen Untersuchung und Diagnostik.“ Würzburg 1894.

5. Hüppe, „Methode der Bakterienforschung“, 3. Auflage. Wiesbaden 1886.

6. Uffelmann, „Handbuch der Hygiene.“ Wien und Leipzig 1890.